



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 768**

21 Número de solicitud: 200700541

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **01.03.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**14.01.2010**

62 Número de la solicitud inicial: **200402758**

71 Solicitante/s:

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Pallás Benet, Vicente;  
Sánchez-Navarro, Jesús Ángel;  
Aparicio Herrero, Frederic y  
Herranz Gordo, M<sup>a</sup> Carmen**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento para la detección simultánea de viroides mediante el uso de polisondas.**

57 Resumen:

Procedimiento para la detección simultánea de viroides mediante el uso de polisondas.

La patente consiste en la utilización de una polisonda para la detección de un número variable de secuencias nucleotídicas, mediante hibridación molecular. El sistema supone la clonación en tandem de varios fragmentos genómicos distintos en un mismo vector plasmídico lo cual permite la síntesis en la misma reacción de transcripción, de una única sonda de RNA o DNA. La invención reúne por un lado, la sensibilidad que confiere la hibridación molecular y por otro, permite disminuir los costes y el tiempo necesarios para la realización de los análisis. Es de aplicación principalmente en el campo del Fitodiagnóstico.

ES 2 331 768 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección simultánea de viroides mediante el uso de polisondas.

## 5 Sector de la técnica

La técnica se englobaría dentro del sector Agroalimentario y Biotecnológico con aplicaciones principalmente en el campo del Fitodiagnóstico y en la utilización de herramientas moleculares para la detección de organismos modificados genéticamente.

10

## Estado de la técnica

Las especies cultivadas son susceptibles de sufrir un gran número de enfermedades virales que repercuten en su rendimiento y producción y que por tanto ocasionan importantes pérdidas económicas. En las infecciones ocasionadas por hongos y bacterias es posible un control de tipo químico para la erradicación de la enfermedad, pero en virus y viroides la principal estrategia de lucha contra el patógeno es el diagnóstico precoz; por lo que resulta de especial relevancia el desarrollo de métodos de detección sensibles, económicos y rápidos que permitan un diagnóstico fiable de la infección.

Los árboles frutales constituyen un cultivo de especial relevancia dentro del sector agroalimentario. Se conocen al menos 10 virus que afectan de manera significativa a estos cultivos y que pueden detectarse de manera individualizada por métodos serológicos y/o moleculares.

Uno de los principales objetivos actuales en el campo del Diagnóstico Molecular consiste en economizar en la medida de lo posible el análisis rutinario de gran número de muestras. Esto es válido tanto para el fitodiagnóstico de virus vegetales como en la detección de genes o transgenes en productos de alimentos.

Así, sería aconsejable encontrar un método de detección lo suficientemente sensible, rápido, económico y susceptible de automatización, que permita la detección simultánea del mayor número de virus posible y facilite por tanto el trabajo en los programas de certificación de frutales y de otras plantas cultivadas en general y por otro el control de las partidas en el caso de alimentos.

Los virus de plantas se componen de dos tipos de moléculas: informativas (ácidos nucleicos) y funcionales (proteínas) y los métodos de diagnóstico se han ido desarrollando en base al progreso obtenido en la detección de ambos tipos de moléculas. Hasta hace relativamente poco tiempo, para la detección de virus de plantas, sólo se utilizaban de forma rutinaria los métodos basados en el componente proteico. Entre ellos, la técnica serológica más utilizada por su sencillez, sensibilidad y fácil automatización, ha sido el ensayo tipo ELISA. Sin embargo y en detrimento de su sensibilidad, este método presenta la desventaja de que sólo un 2-5% de la secuencia del virus actúa como determinante antigénico (Hull, R.; The potential for using dot-blot hybridisation in the detection of plant viruses. In *Developments and applications of virus testing*, ed. R.A.C. Jones, L. Torrance. pp. 3-12, Suffok, Lavenham, 1986).

Durante los últimos años y gracias a la incorporación de la tecnología del DNA recombinante a la Virología Vegetal, ha sido posible el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en el componente genómico de los virus, entre los que cabe destacar dos técnicas: la hibridación molecular y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica es también la base de los sistemas de detección de plantas o alimentos transgénicos. En este último caso los métodos de diagnóstico pueden estar basados en la detección de la secuencia del transgen introducido y en el caso de mezclas o alimentos elaborados, de la presencia o no de secuencias de nucleótidos que controlan la expresión y selección de transgenes, siendo las más habituales las secuencias representativas del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, la secuencia de poliadenilación del gen de la síntesis de nopalina y los genes de resistencia a ampicilina, kanamicina y tetraciclina. También sería útil en sistemas de discriminación de muestras en procesos de mejora genética por identificación de genes o marcadores, en identificación varietal o de especies, etc.

La *hibridación molecular* como método de diagnóstico en Virología Vegetal fue utilizada por primera vez para la detección de viroides (Owens, R.A. and Diener, T.O. (1981) Sensitive and rapid diagnosis of *Potato spindle tuber viroid* disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213, 670-672.) y posteriormente para la de virus vegetales (Maule A.J., Hull R, Donson J. (1983) The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *J. Virol. Methods*. 6, 215-24.; Garger S.J., Turpen, T., Carrington, J.C., Morris, T.J., Dodds, J.A., Jordan, R.L. and Grill, L.K. (1983). Rapid detection of plant RNA viruses by dot blot hybridization. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1, 21-25.). Esta técnica se basa en la complementariedad de las dos cadenas constituyentes de un ácido nucleico bicatenario y el resultado es la formación de un híbrido entre la secuencia de nucleótidos del virus a detectar y una secuencia complementaria marcada a la que se denomina sonda (Pallás, V., Más, P. and Sánchez-Navarro, J.A., (1998a). Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. In: *Plant virus protocols: from virus isolation to transgenic resistance. Methods in Molecular Virology*. Humana Press, Totowa. 81, 461-468). Para la síntesis de la sonda, el RNA viral es retrotranscrito y amplificado por PCR obteniéndose un DNA de doble cadena copia del genoma viral. Dicho fragmento se clona en un plásmido que contiene los promotores de dos RNA polimerasas, una permitirá la síntesis de RNA viral de polaridad positiva y la otra la del de polaridad negativa. Para el marcaje de la sonda se pueden utilizar precursores radiactivos o no radiactivos en la reacción de transcripción. Los últimos hacen de la hibridación molecular una técnica más accesible facilitando en gran medida su manejo. Entre los precursores

no radiactivos los más comunes son los derivados de la biotina y de la digoxigenina. En la presente propuesta se ha utilizado la digoxigenina, un hapteno que se incorpora a los residuos de uridina mediante métodos enzimáticos convencionales y cuya detección se lleva a cabo con un anticuerpo específico.

5 La variante que más comúnmente se utiliza en hibridación molecular es la de 'dot-blot' en la que la solución de ácidos nucleicos es aplicada directamente sobre un soporte sólido, como por ejemplo una membrana de nitrocelulosa o nylon, y detectada con una sonda específica marcada.

10 La segunda técnica, el PCR, utiliza un enzima con capacidad para amplificar de forma exponencial secuencias específicas de DNA, lo cual requiere de un paso previo de retrotranscripción reversa (RT) en los virus de RNA, para la obtención de un DNA copia del genoma viral (Pallás, V., Sánchez-Navarro, J.A., Más, P., Cañizares, M. C., Aparicio, F., and Marcos, J. F. (1998b). Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes. *Options Méditerran.* 19, 191-208), mientras que en alimentos esta paso no es necesario pues lo que se detecta directamente es el DNA genómico presente en la muestra. Se trata de un método extremadamente sensible y que por  
15 tanto permite detectar concentraciones extraordinariamente bajas del patógeno o del transgen. Esta alta sensibilidad hace que se sobredimensionen las pequeñas contaminaciones y que por tanto se requieran unas condiciones de trabajo muy estrictas no disponibles en laboratorios poco especializados.

20 La incorporación de los métodos moleculares ha supuesto una espectacular mejora de la sensibilidad. La elección de uno u otro método dependerá del tipo de análisis. No obstante, en los programas de certificación de frutales podría aceptarse como norma general el uso de métodos serológicos o la hibridación molecular no radiactiva, mientras que el PCR sería utilizado en análisis que requieran de una mayor sensibilidad como es el caso de las plantas madre, material prebásico, material importado, yemas durmientes durante el periodo de cuarentena o para fines sanitarios. En el caso de alimentos, en el control de materias primas en la recepción de fábrica o en pequeños laboratorios de  
25 análisis que confirmen la presencia o no de transgenes, mezcla de diferentes productos o especies, o la presencia o no de bacterias y hongos productores de toxinas o contaminantes, para asegurar la trazabilidad del alimento como libre de transgénicos, o de contaminantes o que no se trata de un sucedáneo o una mezcla de productos de inferior calidad, se utilizará la hibridación molecular. Sin embargo cuando se requiera un análisis más fino o de confirmación para detectar la presencia de un transgen concreto o determinar cual puede ser su origen se recurrirá a técnicas basadas en PCR.

30 Los mayores esfuerzos en los últimos años han ido encaminados a contribuir al desarrollo de métodos de diagnóstico más rápidos y económicos, mediante la detección simultánea del mayor número de secuencias posible (transgenes, sus secuencias de control, genes o marcadores específicos o patógenos como virus, viroides, bacterias u hongos sean patógenos para la planta, productores de toxinas o contaminantes en alimentos), ya sea incluyendo en la reacción de  
35 amplificación un cóctel con los cebadores específicos o mezclando las sondas individuales de cada uno de ellos detectando simultáneamente varias secuencias. Como ejemplos de la primera estrategia cabe destacar la detección mediante RT-PCR múltiple de los tres principales Ilarvirus que afectan a frutales de hueso (Saade, M., Aparicio, F., Sánchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallas, V. (2000). Simultaneous detection of the three Ilarviruses affecting stone fruits by non-isotopic molecular hybridization and multiplex RT-PCR. *Phytopathology* 90, 1330-1336), la de seis virus que afectan al olivo (Bertolini, E., Olmos, A., Martinez, M.C., Gorris, M.T., Cambra, M. (2001). Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol. Methods* 96, 33-41.) y los cuatro virus que afectan a fresa (Thompson, 2003). La hibridación molecular múltiple se ha  
40 utilizado con éxito para la detección simultánea de los principales virus que afectan a cultivos ornamentales (Sánchez-Navarro, J. A., Cañizares, M.C., Cano, E.A., Pallás, V. (1999). Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridisation. *J. Virol. Methods* 82, 167-75), hortícolas (Saldarelli, P., Barbarossa, L., Grieco, F., and Gallitelli, D. (1996). Digoxigenin-labelled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Dis.* 80, 1343-1346) y leñosas (Saade, M., Aparicio, F., Sánchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallas, V. (2000). Simultaneous detection of the three Ilarviruses affecting stone fruits by non-isotopic molecular hybridization and multiplex RT-PCR. *Phytopathology* 90, 1330-1336).

50 En la presente invención se ha desarrollado una estrategia que ha permitido en primer lugar la detección simultánea de virus, viroides, pues se contaba con más experiencia en este ámbito y en un segundo paso se ha extendido a la detección de transgenes, o marcadores génicos y todo ello de una forma más económica y rápida. De este modo, además de mantener las ventajas de la hibridación molecular individualizada, permite disminuir los costes y el tiempo  
55 necesarios para el diagnóstico, así como normalizar la cantidad de sonda que reconoce a cada virus. Esta estrategia constituye un nuevo concepto en el campo de la detección de ácidos nucleicos al ser necesario una única síntesis de sonda para la detección de un número variable de secuencias nucleotídicas.

### Descripción de la invención

60 La técnica que aquí se describe consiste en la clonación en tandem de varios fragmentos genómicos distintos en un mismo vector plasmídico lo cual permite la síntesis en la misma reacción de transcripción, de una única sonda de RNA o DNA a la que hemos denominado "polisonda", que reconoce a todas las secuencias clonadas. La invención reúne por un lado, la sensibilidad que confiere la hibridación molecular y por otro, permite disminuir los costes y el  
65 tiempo necesarios para la realización de los análisis.

## ES 2 331 768 A1

### Construcción de la polisonda

Para la obtención de la polisonda se amplifican mediante PCR fragmentos genómicos representativos de la secuencia que se quiera detectar. El tamaño mínimo de los mismos puede ser de 50 pares de bases aunque para tener una mayor sensibilidad es recomendable utilizar fragmentos de alrededor de unas 200 pares de bases (pb). Para la realización de cada PCR se diseñan cebadores específicos de las secuencias a detectar, con los sitios de restricción correspondientes compatibles con el vector que se vaya a utilizar para la realización de la clonación. Tras realizar las subclonaciones necesarias se obtiene un clon con los fragmentos genómicos en tandem o con secuencias específicas de separación para facilitar que no existan impedimentos estéricos que compliquen la hibridación con fragmentos adyacentes. El número de sondas individuales que se pueden incluir en la polisonda depende por un lado del tamaño de las sondas individuales y del tamaño del inserto máximo que permita el vector escogido. Se han utilizado sin problemas 1200 bases. Una vez obtenido el clon se genera la polisonda. Dependiendo de si se trata de polisondas de RNA o de DNA se utilizará un enzima u otro y un sistema de detección basado en marcaje con oligonucleótidos radiactivos, digoxigenina, biotina o cualquier otro método de marcaje estándar que se escoja. En principio la técnica radiactiva requiere instalación autorizada y tendría menor aplicabilidad industrial, pero sería factible.

### Toma de muestras

Se realiza la extracción de RNA/DNA en función de la estrategia elegida, utilizando un protocolo estándar o el específico descrito en los ejemplos. El tipo de material de origen puede obligar a modificar levemente los protocolos para obtener mayor rendimiento. Una vez extraída la muestra es necesario desnaturalizarla.

### Detección

El método descrito es un dot blot que utiliza membranas de nylon, sería factible adaptarlo a nitrocelulosa, pero también sería aplicable, en pocillos (titer, microtiter) o en vidrio (microchips) o cualquier otro método colorimétrico. Para ello, se fija o bien la muestra en el caso de que se añada la sonda al tampón de hibridación, o la sonda si lo que se añade a la solución de hibridación es la muestra desnaturalizada. Se procede a realizar la hibridación a la temperatura adecuada según se trate de una hibridación RNA/RNA; DNA/RNA o DNA/DNA. Una vez transcurrido el tiempo determinado de hibridación, el cual depende del tamaño de pares de bases de la sonda, se procede al lavado cuyas condiciones son variables según los condicionantes anteriores. A continuación se realizaría la detección utilizando para ello un método radiactivo, colorimétrico o por emisión de luz dependiendo del sistema de marcaje de la polisonda escogido.

### Ejemplo de realización de la invención

#### Ejemplo 1

#### Detección de viroides en cultivos comerciales

Los viroides son los patógenos de plantas más pequeños que se conocen. Su genoma está constituido por una única cadena de RNA de doble cadena con un tamaño comprendido entre 246 y 399 residuos de nucleótidos que no codifican para ninguna proteína. La incapacidad de expresar componentes proteicos ha condicionado significativamente los métodos de detección, impidiendo la utilización de las tecnologías de análisis serológicas. En este sentido, la detección de patologías de naturaleza viroidal se han realizado mediante bioensayos y métodos moleculares tales como la RT-PCR o la hibridación molecular. Esta última tecnología se está implantando como técnica rutinaria de análisis de viroides dada su fiabilidad, economía, sensibilidad y capacidad de análisis (referencia).

En la presente invención, se propone incorporar el concepto de POLISONDA para la detección de los principales viroides de frutales: el viroide del mosaico latente del melocotonero (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) y el viroide del enanismo del lúpulo (*Hop stunt viroid*, HSVd).

Para la realización de la POLISONDA se clonarían en tandem los fragmentos genómicos correspondientes al PLMVd (SEQ ID 1. Oligo sentido: 5'-ATTAAAGACCTCTCAGCCCC-3', SEQ ID 3; oligo antisentido: 5'-CACCCCCCTCGGAACCAA-3' SEQ ID 4) y el HSVd (SEQ ID 2. Oligo sentido: 5'-TTACCTGAGAAAGGAGCC-3' SEQ ID 5; oligo antisentido: 5'-CCAGGAGAAGGTAAAAGAAG-3' SEQ ID 6) en un mismo vector plasmídico utilizando sitios de restricción apropiados.

La síntesis de la polisonda se realizaría linearizando con el enzima de restricción correspondiente en este caso *Xho*I y transcrito con la T7 RNA polimerasa o si fuera el caso la T3 RNA polimerasa (sondas RNA), utilizándose uridina marcada con digoxigenina. La transcripción se llevó a cabo según la descripción previa de Más, P., Sánchez-Navarro, J.A., Sánchez-Pina, M.A., and Pallás, V. (1993). Chemiluminescent and colorigenic detection of *Cherry leaf roll virus* with digoxigenin-labeled RNA probes. *J. Virol. Methods* 45, 93-102. y Pallás, V., Más, P. and Sánchez-Navarro, J.A., (1998a). Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. *In: Plant virus protocols: from virus isolation to transgenic resistance. Methods in Molecular Virology*. Humana Press, Totowa. 81, 461-468. También se podría realizar mediante una reacción de PCR utilizando los oligos directo y reverso (sonda DNA) utilizándose en ambos casos, uridina marcada con digoxigenina. Tras realizar las subclonaciones necesarias se obtuvo un clon con los dos fragmentos genómicos en tandem.

*Extracción de RNAs*

Para la extracción de los RNAs de la planta existen muchos métodos que utilizan disolventes orgánicos tóxicos como por ejemplo el fenol, lo que resulta un inconveniente para los laboratorios de diagnosis en los que se procesan un gran número de muestras. En nuestro laboratorio utilizamos para la preparación de los extractos a analizar un método que fue descrito en principio para la extracción de DNA genómico (Dellaporta, S., Woods, H. and Hicks, J. (1983). A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19-21), más tarde fue puesto a punto para la obtención de extractos ricos en RNAs viroidales (Pallas, V., Navarro, A. y Flores, R. (1987). Isolation of viroid-like RNA from hop different from hop stunt viroid. *J. Gen. Virol.* 68, 3201-3205.), purificación de RNAs de doble cadena (De Paulo, J. and Powell, C. (1995) Extraction of double stranded RNA from plant tissues without the use of organic solvents. *Plant. Dis.* 79, 246-248.) y finalmente para la detección de viroides (Astruc, N., Marcos, J.F., Macquaire, G., Candresse, T., Pallás, V. (1996). Studies on the diagnosis of Hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 837-846.; Cañizares, M.C., Marcos, J.F. and Pallás, V. (1998). Studies on the incidence of Hop stunt viroid in apricot trees (*Prunus armeniaca*) by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. *Acta Hort.* 472, 581-585).

Se homogenizaron 0.5 gramos de hoja o fruto en 5ml de tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM EDTA pH 7.0, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol). A 1 ml de homogenado se le añadieron 50  $\mu$ l de SDS 20% y se incubaron 20 minutos a 65°C. A continuación se añadieron 250  $\mu$ l de acetato potásico 5 M y se incubó 20 minutos a 0°C. Seguidamente se centrifuga 15 minutos a 12000 g y el sobrenadante se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol a -20°C. Se centrifugó de nuevo 15 minutos a 12000 g y el pellet se resuspendió en 40-50  $\mu$ l de agua estéril.

Antes de aplicar la muestra en la membrana es necesario desnaturalizarla. Para ello, a 5  $\mu$ l de muestra se le añadieron 3  $\mu$ l de SSC 20x y 2  $\mu$ l de formaldehído 37% y se incubó a 60°C durante 15 minutos. Se aplicaron 5  $\mu$ l en la membrana de nylon y los RNAs se fijaron con un UV crosslinker (700 x 100  $\mu$ J/cm<sup>2</sup>). A continuación se incubó la membrana inicialmente con un tampón de hibridación (50% formamida, SSC 5x, 0.1% N-Laurosylsarcosine, 0.02% SDS, Blocking reagent solution) a 68°C durante 1 hora y posteriormente con la sonda diluida en dicho tampón a 68°C (sonda RNA) o 50°C (sonda DNA) y durante 5 horas mínimo. Transcurrido este tiempo la membrana se lavó dos veces durante 5 minutos en SSC 2X / SDS 0.1% a temperatura ambiente seguido de dos lavados de 15 minutos a 68°C en SSC 0.1X / SDS 0.1%. El resto del proceso se realizó a temperatura ambiente. A continuación la membrana se incubó 5 minutos en tampón de lavado (TL: 0.1 M ácido maleico pH 7.5, 0.15 M cloruro sódico, 0.3% Tween 20). Seguidamente se bloqueó la membrana durante 30 minutos con 0.1 M ácido maleico pH 7.5, 0.15 M cloruro sódico + Blocking IX y luego se incubó con el anticuerpo durante 30 minutos (Anti digoxigenin-AP Fab fragments (1:10000)).

Finalmente la membrana se lavó con TL dos veces durante 15 minutos, 5 minutos con un tampón que contenía 0.1 M Tris pH 9.5, 0.1 M NaCl y se incubó con el sustrato disuelto en este mismo tampón 5 minutos, se eliminó el exceso de líquido y la membrana se expuso frente a una película autorradiográfica durante 15-25 minutos.

Seguidamente se realizaron las pruebas pertinentes para comprobar que nuestra polisonda era al menos igual de sensible que cada una de las sondas individuales. Para ello, se llevaron a cabo análisis tipo dot-blot utilizando muestras infectadas de manera individual con cada uno de los viroides a detectar.

## Ejemplo 2

*Evaluación del estado sanitario de bancos de germoplasma*

El mantenimiento de la biodiversidad es un problema importante que ha ido adquiriendo relevancia de forma progresiva en nuestra sociedad. La conservación de la biodiversidad, puede aplicarse a tres niveles de organización: génica, orgánica y ecológica. Sin embargo, y a pesar de los avances de la ingeniería genética, de momento los genes no se conservan de forma individual sino formando parte de organismos, poblaciones o ecosistemas.

A pesar de que se asume de forma universal que el método más efectivo y eficiente para la conservación es la protección de los habitats también está reconocido que las técnicas de conservación *ex situ* complementan a las anteriores almacenando germoplasma representativo de las poblaciones a largo plazo y aportando una serie de ventajas claras tales como el control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad.

Una componente fundamental de la conservación *ex situ* serían los métodos de propagación y cultivo en los que el material almacenado se utiliza en operaciones de conservación *in vivo*. Es muy importante por esto un seguimiento del estado sanitario de los bancos de germoplasma y para ello es necesario tener puesto a punto métodos de detección sensibles, rápidos y económicos. Es obvio para todo aquel experto en el área de la presente invención que la evaluación del estado sanitario de los bancos de germoplasma de árboles frutales podría llevarse a cabo mediante el uso de la polisonda descrita en el ejemplo anterior. Para otros viroides el diseño sería específico para las secuencias de interés en cada caso, pero las condiciones de hibridación y detección serían equivalentes.

# ES 2 331 768 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la detección simultánea de diferentes secuencias de viroides **caracterizado** por el uso de polisondas con las siguientes características
  - a. comprenden más de un fragmento de DNA/RNA (al menos dos),
  - b. los fragmentos de a) se hayan fusionados en tandem o flanqueados por ciertas secuencias separadora
  - 10 c. sintetizadas en una única sonda de DNA o RNA, a partir de un único vector plasmídico, y
  - d. su detección se realiza mediante hibridación complementaria con secuencias de viroides.
- 15 2. Procedimiento para la detección simultánea de diferentes secuencias de ácidos nucleicos según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los fragmentos de DNA/RNA fusionados tienen cada uno al menos 50 pares de bases, preferentemente aunque 200 pares de bases para obtener una mayor sensibilidad.
- 20 3. Procedimiento para la detección simultánea de diferentes secuencias de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque la polisonda es capaz de detectar las secuencias representativas de más de un virus presente en un grupo de plantas.
- 25 4. Procedimiento para la detección simultánea de diferentes secuencias de ácidos nucleicos según la reivindicación 3 **caracterizado** porque la polisonda es capaz de detectar las secuencias representativas de los principales virus que afectan a frutales de hueso en cultivos comerciales.
- 30 5. Procedimiento para la detección simultánea de diferentes secuencias de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 1 a 2 **caracterizado** porque la polisonda es capaz de detectar las secuencias representativas de más de un viroide presente en un grupo de plantas.
- 35 6. Procedimiento para la detección simultánea de diferentes secuencias de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** porque la polisonda es capaz de detectar las secuencias representativas viroide del mosaico latente del melocotonero (Peach latent mosaic viroid, PLMVd) SEQ ID 1 y la secuencia representativa del viroide del enanismo del lúpulo (Hop stunt viroid, HSVd) SEQ ID2.
- 40 7. Procedimiento para la detección simultánea de diferentes secuencias de ácidos nucleicos según la reivindicación 6 **caracterizado** porque se realiza a partir de la pareja de oligonucleótidos específicos del viroide del mosaico latente del melocotonero (Peach latent mosaic viroid, PLMVd) SEQ ID 3 y 4 y mediante la pareja de oligonucleótidos específicos del viroide del enanismo del lúpulo (Hop stunt viroid, HSVd) SEQ ID 5 y 6.
- 45 8. Secuencia de nucleótidos denominada polisonda **caracterizada** porque según las reivindicaciones 1 a 7 está constituida por más de un fragmento de DNA/RNA (sonda individual) fusionados en tandem o flanqueados por ciertas secuencias separadoras, en un único vector plasmídico, que mediante hibridación complementaria detectan al menos una secuencia de ácidos nucleicos correspondiente a patógenos como viroides.
- 50 9. Secuencia de nucleótidos denominada polisonda según la reivindicación 8 **caracterizada** porque está constituida por fragmentos fusionados de DNA/RNA, cada uno con un tamaño mínimo de 50 pares de bases, preferentemente 200 pares de bases para obtener una mayor sensibilidad.
- 55 10. Secuencia de nucleótidos denominada polisonda según las reivindicaciones 8 **caracterizada** porque incluye las secuencias capaces de detectar el genoma de de más de un viroide presente en un grupo de plantas.
- 60 11. Secuencia de nucleótidos denominada polisonda según las reivindicaciones 8 a 10 **caracterizada** porque incluye las secuencias capaces de detectar el viroide del mosaico latente del melocotonero (Peach latent mosaic viroid, PLMVd) y el viroide del enanismo del lúpulo (Hop stunt viroid, HSVd).
- 65 12. Secuencia de nucleótidos denominada polisonda según las reivindicaciones 8 a 12 **caracterizada** porque incluye las secuencias capaces de detectar la SEQ ID 1 secuencia representativa del viroide del mosaico latente del melocotonero (Peach latent mosaic viroid, PLMVd) y la SEQ ID2 secuencia representativa del viroide del enanismo del lúpulo (Hop stunt viroid, HSVd).
13. Kit de detección de secuencias de nucleótidos de muestras vegetales o animales **caracterizado** por contener las secuencias y realizarse mediante el procedimiento indicados en las reivindicaciones 1 a 12.
14. Uso del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 13 para el control de contaminaciones por viroides que contenga secuencias de ácidos nucleicos diferenciadoras tanto en muestras vegetales como animales.
15. Uso del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 14 para el control de contaminaciones de patógenos de plantas en viveros, empresas productoras de plantas madre y centros de certificación sanitaria.



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 331 768

② Nº de solicitud: 200700541

② Fecha de presentación de la solicitud: 01.03.2007

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)  
C12Q 1/70 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BASE DE DATOS EMBL-EBI [Online]. "Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures"; 11.12.2009. Recuperado de EBI con no. acceso EM_VI:M83545. 100% identidad con SEQ. ID. Nº. 1.	1-15
A	BASE DE DATOS EMBL-EBI [Online]. "Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of hop stunt viroid group"; 11.12.2009. Recuperado de EBI con no. acceso EM_VI:X06719. 100% identidad con SEQ. ID. Nº. 2.	1-15
A	SHAMLOUL A. M. et al. "Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription-polymerase chain reaction-probe capture hybridization". Journal of Virological Methods. 1999. Vol. 80, Nº. 2, páginas 145-155. ISSN 0166-0934.	1-15

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

22.12.2009

**Examinador**

J. Manso Tomico

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, BUSQUEDA SECUENCIAS (Ebi-site).



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.12.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BASE DE DATOS EMBL-EBI [Online]. ""Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammer-head structures"; 11.12.2009. Recuperado de EBI con no. acceso EM_VI:M83545. 100% identidad con SEQ.ID.Nº. 1.	11-12-2009
D02	BASE DE DATOS EMBL-EBI [Online]. "Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of hop stunt viroid group"; 11.12.2009. Recuperado de EBI con no. acceso EM_VI:X06719. 100% identidad con SEQ. ID. Nº. 2.	11-12-2009
D03	Shamloul A. M. et al. "Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription- polymerase chain reaction-probe capture hybridization". Journal of Virological Methods. 1999. Vol. 80, Nº. 2, páginas 145-155. ISSN 0166-0934.	1999

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga una secuencia denominada polisonda y un procedimiento para la detección simultánea de virus presentes en plantas.

En concreto las reivindicaciones 8-12 divulgan la secuencia caracterizada por incluir secuencias de los siguientes virus: PLMVd, HSVd. Las reivindicaciones 1-7 divulgan un procedimiento para la detección simultánea de los diferentes genomas de los virus mencionados, por técnicas de hibridación complementaria con la polisonda diseñada. Las reivindicación 13 divulga un Kit de detección y las reivindicaciones 14 y 15 divulgan el uso de la polisonda para el control de contaminaciones por virus.

D01 divulga una secuencia RNA con una identidad del 100% con la SEQ. ID. Nº 1. Igualmente, D02 divulga una secuencia RNA con una identidad 100% con SEQ. ID. Nº. 2.

D03 divulga un método de identificación de virus frutales haciendo uso de una RT-PCR y detección del amplicon resultante mediante un sistema de hibridación colorimétrica utilizando una sonda de cDNA biotinilada (tabla 2) de 21-22 nucleótidos.

Aunque las secuencias por separado, ya son conocidas en el estado de la técnica, ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan una polisonda de fragmentos fusionados en tándem que incluya "secuencias capaces de detectar" SEQ. ID. Nº 1 y 2, ni un procedimiento idéntico al reivindicado. Por tanto las reivindicaciones 1-15 serían nuevas según lo mencionado en el art. 6 de la LP.

Tomando D03 como el documento más cercano del estado de la técnica, la diferencia entre este documento y el objeto de las reivindicaciones 1-7 sería que la sonda utilizada para detectar los productos amplificados en una anterior PCR comprende fragmentos de distintos genomas de los virus PLMVd, HSVd, fusionados en tandem.

El efecto técnico, producto de esa diferencia, sería la simultaneidad en la detección de los dos virus mencionados y la reducción de pasos de hibridación a realizar.

Por tanto, el problema que plantea la solicitud sería la provisión de productos y procedimientos para la detección simultánea (en un solo paso) de los dos virus PLMVd, HSVd. La solución sería la construcción de la polisonda de la reivindicación 12.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica tomados de manera aislada o en combinación proponen la fusión de los fragmentos que incluyan ""secuencias capaces de detectar" SEQ. ID. Nº 1 y 2, para la construcción de un multi-fragmento mayor llamado polisonda. Por tanto, las reivindicaciones 1-15 tendrían actividad inventiva según lo mencionado en el art. 8 de la LP.